

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2003年 6月13日

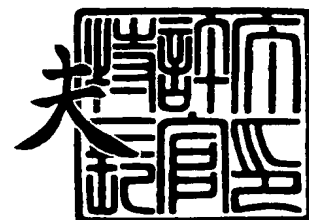
出願番号  
Application Number: 特願2003-168941  
[ST. 10/C]: [JP2003-168941]

出願人  
Applicant(s): 平石 明  
株式会社エヌ・シー・アイ・エム・ビー・ジャパン

2003年11月17日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号 出証特2003-3094901

【書類名】 特許願

【整理番号】 H15P1027

【あて先】 特許庁長官 太田 信一郎 殿

【国際特許分類】 C12Q 1/04

【発明者】

    【住所又は居所】 愛知県豊橋市北山町字東浦 2 - 1 合同宿舎 5 - 3 0 2

    【氏名】 平石 明

【特許出願人】

    【識別番号】 501466307

    【氏名又は名称】 平石 明

【特許出願人】

    【識別番号】 398004161

    【氏名又は名称】 株式会社エヌ・シー・アイ・エム・ビー・ジャパン

【代理人】

    【識別番号】 100103654

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 藤田 邦彦

    【電話番号】 06-6364-0693

【選任した代理人】

    【識別番号】 100087996

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 福田 進

    【電話番号】 06-6364-0693

【選任した代理人】

    【識別番号】 100118522

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 藤田 典彦

    【電話番号】 06-6364-0693

## 【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2003- 31488

【出願日】 平成15年 2月 7日

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 033226

【納付金額】 21,000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 微生物の分子生物学的同定技術

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ITS領域に相当するDNA（ITS-DNA）の交雑形成法を用いることを特徴とする微生物の分子生物学的同定技術。

【請求項 2】

請求項 1 記載のITS-DNA交雑を、メンブランフィルター上で行うことを特徴とする微生物の分子生物学的同定技術。

【請求項 3】

請求項 1 記載のITS-DNA交雑を、マイクロプレート上で行うことを特徴とする微生物の分子生物学的同定技術。

【請求項 4】

請求項 1 記載のITS-DNA交雑を、DNAマイクロアレイ上で行うことを特徴とする微生物の分子生物学的同定技術。

【請求項 5】

請求項 2， 3， 4 のいずれかに記載の技術を、微生物株の同定に利用することを特徴とする微生物の分子生物学的同定技術。

【請求項 6】

請求項 2， 3， 4 のいずれかに記載の技術を、食材・食品・飲料中の微生物検出・同定に利用することを特徴とする微生物の分子生物学的同定技術。

【請求項 7】

請求項 2， 3， 4 のいずれかに記載の技術を、臨床・腸内細菌を含む生体中の微生物検出・同定に利用することを特徴とする微生物の分子生物学的同定技術。

【請求項 8】

請求項 2， 3， 4 のいずれかに記載の技術を、その他の環境中の微生物検出・同定に利用することを特徴とする微生物の分子生物学的同定技術。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1】

**【発明の属する技術分野】**

本発明は、微生物の検出、同定、DNA-DNA交雑形成技術、DNAマクロアレイ技術、DNAマイクロアレイ技術の分野に関する。

**【0002】****【従来の技術】**

細菌を中心とする微生物の分類・同定は、従来細胞形態、生理・生化学的性状、化学分類学的性状等の表現型の情報に加え、核酸分子情報に基づいて行われている。属以上の高次分類群の分類・識別には小サブユニットrRNA（あるいはその遺伝子である小サブユニットrDNA）の塩基配列の比較が有効であるが、菌種レベルでの識別・同定にはこの分子技法の適用は解像度の低さのため困難である。また、単一の性状によって、あるいは表現型の組み合わせによって菌種を同定することも困難である。

**【0003】**

菌種識別の唯一の技術として現在、異なる菌株間のゲノムDNAの交雑形成率（DNA-DNA相同性）が用いられている。国際細菌分類委員会は70%以上のDNA-DNA交雑形成率を示す菌株の集団を遺伝的な同一種として認めることを推奨しており（例えば、非特許文献1参照）、この基準は現在も踏襲されている。

**【0004】****【非特許文献1】**

Wayne et al. Int. J. Syst. Bacteriol. 37, 1987年, P.463-464

**【0005】**

ゲノムDNA-DNA交雑形成法においてはいくつかの技術的欠点がある。本法では比較的大量のきれいなDNA試料が必要であり、そのため菌体培養、細胞からのDNAの抽出、精製、被検体およびプローブ試料作成などに労力や時間を要する。また、交雑試験の再現性が低い、きょう雑物の混入により結果が左右されやすい、などの欠点がある。また、本法は培養できる純粋菌株間の試験を前提としており、複合微生物系である環境試料には適用しにくい。また、DNAが得られにくい試料の場合も適用が難しい。

**【0006】**

ゲノムDNA-DNA相同性に替わる菌種同定のための分子技法として例えばgyrB遺伝子の塩基配列を比較する方法が提案されている（特許文献1参照）。

【0 0 0 7】

【特許文献1】

特開 2 0 0 1 - 1 2 8 6 7 9 号公報

【0 0 0 8】

しかし、塩基配列を決定する方法では、DNA-DNA交雑形成法と同様に時間がかかるのみならず、菌種により増幅プライマーの検討が必要という欠点は改善されない。また、環境中の複数の微生物に対しての同定には適用困難である。

【0 0 0 9】

rRNA遺伝子オペロン中に存在するITS領域（図1）は変化に富む塩基配列を含むことから、真正細菌検出のためのプローブ開発について有効性が示唆され（例えば、非特許文献2参照）、現在その塩基配列の情報が微生物の識別に使われている。ここに、ITSとは、intergenic transcribed spacer（リボソームRNA Spacer）の略称である（本明細書では、このように略して用いる）。

【0 0 1 0】

【非特許文献2】

Barry et al. PCR Methods Appl. 1、1991年、P.51-56

【0 0 1 1】

ITS領域に由来する菌種に特異的な配列のオリゴプローブを用いた真正細菌分類群の検出、単離および区別する方法が提案されている（例えば、特許文献2参照）。しかし、特異的な配列のオリゴプローブを用いるこの方法は、プローブの設計に菌種の配列情報が必要である。また、菌種の識別は定性反応である。

【0 0 1 2】

【特許文献2】

特表平 1 0 - 5 0 1 9 7 6 号公報

【0 0 1 3】

ユニバーサルプライマーを用いた多コピーITS領域全てを含めた交雑形成に関する報告はこれまでになく、そのITS交雑形成率がゲノムDNAの交雑形成率と比較

して菌種識別に有効かどうか具体的知見はない。またITS交雑形成率に対する定量評価(相対的強度)に関する報告はこれまでにない。

【 0 0 1 4 】

DNAマイクロアレイ法によるITS交雑形成技術はこれまで報告されていない。

【 0 0 1 5 】

【発明が解決しようとする課題】

上述の従来知見と技術の背景下に、本発明はDNA-DNA交雑形成法に替わり得る定量性と解像度を有し、かつ特定の塩基配列情報を必要としない微生物菌種の分子生物学的識別・検出技術を開発し、従来より迅速、簡便、かつ正確に菌種の同定を行うことを目的とする。さらに、本発明の目的は、この技術をDNAマイクロアレイと組み合わせることにより、多数の菌種を同時に効率的に同定することを可能にする環境微生物診断法としての新技术を提供することにある。

【 0 0 1 6 】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、前記目的を達成すべく、グラム陰性細菌およびグラム陽性細菌の代表的菌種を微生物保存機関より取り寄せ、また、新たにこれらの細菌を自然環境中から分離し、合計1,500株を対象としてITS領域の解析を行った。

まず、試験菌株からゲノムDNAを抽出・精製し、これらのDNAを鋳型としてITS領域のPCR増幅を行った。これらのPCR産物 (ITS-DNA) をサブクローニングした後、DNAシーケンサーを用いて塩基配列を決定し、同時にDNA-DNA交雑形成試験を行った。異なる菌株間の塩基配列の相違度とDNA-DNA交雑形成率の関係を解析した結果、両者の間には高い相関関係があり、ITS配列相同率約90%がゲノムDNA-DNA交雑形成率70%に相当することが判明した。

これらの知見の基に、ITS-DNAを用いる交雑形成をメンブレンフィルター法により、また、マイクロプレート上で実施し、特定の交雑形成条件下で得られた交雑形成シグナルの強度から、ITS配列交雑形成率60～70%がゲノムDNA-DNA交雑形成率70%に相当することが判明した。

これらの知見から、微生物の検出、同定技術、およびDNAマイクロアレイ技術、DNAマイクロアレイ技術への応用、環境診断法に関する本発明を完成するに至った

。

#### 【0017】

すなわち、本発明では、ITS領域に相当するDNA（ITS-DNA）の交雑形成法を、微生物の検出、同定に用いる。これにより、菌種または近縁種レベルでの識別が可能となる。このことは、ゲノムDNAを用いた交雑形成率とITS-DNAの交雑形成率との間に高い相関があったことに起因する。ゲノムDNAを用いた交雑形成法は現在唯一の菌種識別法として用いられているが、試験に多大な時間や労力を必要とし、また、再現性の高い結果を得るのが難しい。ゲノムDNAと比較して、ITS-DNAはPCR等により遺伝子増幅可能であり、大量の培養を必要とせず、簡便・迅速な解析が可能になるため、有利である。また、高純度のITS-DNAを試験に用いることができるため、比較的高い再現性を持つ。さらに、PCRにユニバーサルプライマーを用いることができるため、他の遺伝子を用いるよりもさらに簡便な解析ができる点でも有利である。

#### 【0018】

このITS-DNA交雑を、メンブランフィルター上あるいはマイクロプレート上で行う。また、前記ITS-DNA交雑を、DNAマイクロアレイ上で行う。これらの技法を用いることにより、菌種または近縁種レベルでの識別が可能となる。さらに、前記ITS-DNA交雑技法を、DNAマイクロアレイ上で行った場合には、多数の菌種を効率的に同定することが可能となるため、未知の環境試料中に含まれる菌種を検出・同定する場合に有利である。

#### 【0019】

また、前記ITS-DNA交雑技法を微生物株の同定に利用する。この場合には、属レベルで特定菌種を固定化したマイクロアレイ（例えば、*Bacillus*、*Pseudomonas*など）または既知の全菌種を固定化したマイクロアレイを用いることにより、菌種レベルでの識別が可能となる。ゲノムDNAを用いた交雑形成法と比較して迅速・簡便であるため、有利である。

#### 【0020】

また、前記ITS-DNA交雑技法を食材・食品・飲料中の微生物検出・同定に利用する。この場合において、食品由来の純粋菌株および食中毒菌由来のITS-DNAを



固定化したマイクロアレイまたは既知の全菌株を固定化したマイクロアレイを用いることにより、近縁菌種レベルでの識別が可能となる。食材・食品・飲料中の微生物を検出する際には、迅速かつ菌株レベルでの菌種の検出を要求される場合が多いため（例えば、食中毒菌、コンタミ菌の検出など）、同定結果からすぐに試料中に含まれる近縁菌株の性状を知ることができる点で、特に有利である。

#### 【0021】

また、前記ITS-DNA交雑技法を臨床・腸内細菌を含む生体中の微生物検出・同定に利用する。例えば、ヒト腸内細菌の場合において、腸管由来の純粋菌株を固定化したマイクロアレイまたは既知の全菌種を固定化したマイクロアレイを用いることにより、近縁菌種レベルでの識別が可能となる。ヒトの腸管内には多くの細菌が存在しており、それらは相互関係を保ちつつ腸内フローラといわれる群集を形成している。腸内フローラはヒトが日常生活で摂取する食事や薬物など数多くの要素により変化し、腸内フローラを構成する細菌もヒトの健康に影響を及ぼすことが知られている。つまり、腸内フローラの構成を簡便・迅速にモニタリングすることが可能になれば、ヒトの健康管理に役立つと考えられる。これまで、腸内フローラの構成を把握するためには、糞便中に含まれる腸内細菌を直接培養するという方法が一般的であった。近年行われている群集解析法（例えば、DGGE, T-RFLP, FISHなど）と比較しても、前記ITS-DNA交雑技法を利用すれば、試料中に含まれる菌株を近縁種レベルで検出でき、各菌株の相対比を見ることができる点で、特に有利である。

#### 【0022】

さらに、前記ITS-DNA交雑技法をその他の環境中の微生物検出・同定に利用する。この場合において、特定な菌種を標的とするマイクロアレイ（例えば、鉄酸化細菌、放線菌、光合成細菌等）または既知の全菌種を固定化したマイクロアレイを用いることにより、近縁菌種レベルでの識別が可能となる。また、環境中の微生物検出においては、培養が困難な菌についても検出できる点で、さらに、多数の菌種を同時に効率よく同定できる点で有利である。

#### 【0023】

#### 【発明の実施の形態】

以下、好ましい実施の形態に基づいて、本発明をさらに詳細に説明する。

#### 【0024】

微生物の中で細菌を例にとると、ゲノムDNA中にrRNAオペロンが1から数コピー存在する。rRNAオペロンは上流より16S、23S、および5S rRNA遺伝子の順に並び、16S rDNAと23S rDNAの間にITS領域が存在する(図1A)。ITSはORFが存在しない変化に富んだランダムな塩基配列からなるが、一部のコピーにはtRNAをコードする保存領域が1～2存在する。このrRNAオペロン全体は同一菌種では比較的保存されているが(配列の相同性99%以上)、異なる菌種間では十分に識別可能な塩基配列の差異(約90%以下)を得ることができる。このrRNAオペロン全体の塩基配列の差異をITS-DNA交雑形成により検出する。

#### 【0025】

ITS-DNA交雑形成の方法の一例として図1Bを用いて説明する。16S rDNAおよび23S rDNAは保存性の高い塩基配列を含むため、それぞれの3'末端および5'末端の保存領域を標的とするPCRプライマーを用いて、菌体から抽出・精製したゲノムDNAを鋳型としてITS-DNAをPCR増幅する(図1Bの1.)。増幅にはPCR以外の技法を用いてもよい。増幅したITS-DNAは、電気泳動、スピンカラム法あるいは他の手段を用いて精製する(図1Bの2.)。精製した標的ITS-DNA試料の一定量をメンブレンフィルターあるいはマイクロプレートにブロッティングし、固定する(図1Bの3.)。別途ITS-DNAを蛍光標識、化学発光標識あるいはその他の方法で標識したプローブを作成する。標的ITS-DNA試料を固定したメンブレンフィルターあるいはマイクロプレートと標識プローブの間でハイブリダイゼーションを行う(図1Bの4.)。交雑したDNAのスポットを蛍光法、化学発光、その他の定法で検出する。

#### 【0026】

ITS-DNAのPCR増幅条件として、PCR反応液の組成と反応条件をそれぞれ表1と表2に示す。プライマーセットはITS-DNAを含む配列をPCR増幅するもの、または、ITS-DNA一部のみをPCR増幅するものであってもよい。1541f(配列番号:1)とLS23r(配列番号:2)を例に挙げて示す。ITS-DNAをPCR増幅できる他のプライマーセットを用いてもよい。PCR反応後、増幅産物の2 $\mu$ lを1.5%アガロースゲ

ル電気泳動で確認する。

【0027】

【表1】


1 反応分当たり

滅菌水	37.75 $\mu$ l
10 $\times$ PCR バッファー	5.0 $\mu$ l
dNTPs (各 2mM)	5.0 $\mu$ l (最終濃度 0.2mM)
20 $\mu$ M 1512f プライマー (配列番号: 1)	0.5 $\mu$ l (最終濃度 0.2 $\mu$ M)
20 $\mu$ M LS23r プライマー (配列番号: 2)	0.5 $\mu$ l (最終濃度 0.2 $\mu$ M)
Taq DNA ポリメラーゼ (5 ユニット/ $\mu$ l) ※2	0.25 $\mu$ l (1.25 ユニット)
ゲノム DNA	1 $\mu$ l (10ng)

※2 QIAGEN の HotStarTaq Polymerase (Cat#203203) を使用。

【0028】

【表2】

95℃	15 分		30 cycles
95℃	30 秒		
50℃	30 秒		
72℃	60 秒		
72℃	7 分		
4℃	ホールド		

【0029】

(配列番号: 1)

配列の長さ: 19

配列の型: RNA

鎖の数: 1 本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

起源

生物名：大腸菌 (*Escherichia coli*)

配列

ggctggatca cctcctt

【 0 0 3 0 】

(配列番号：2)

配列の長さ：17

配列の型：RNA

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

起源

生物名：大腸菌 (*Escherichia coli*)

配列

tgcccaaggc atccacc

【 0 0 3 1 】

PCR 増幅産物の精製はQIA quick PCR Purification Kit (QIAGEN) (注：QIA quickは登録商標) を用いて行った。精製増幅産物は1.5 %アガロースゲル電気泳動に供され、エチジウムブロマイド染色により、増幅が確認された。

【 0 0 3 2 】

メンブレンフィルターを用いてハイブリダイゼーションを行う場合の例を、以下に示す。

【 0 0 3 3 】

メンブレンフィルター (Hybond+, Amersham, Cat#RPN2020B) へのITS-DNAの固定は、以下の条件下で行う。

(1) 適当なサイズにカットしたメンブレンフィルターを蒸留水中に沈めて濡らした後、2×SSC中に10分以上沈めて処理、デシケーターで1日乾燥させる。

- (2) 0.2  $\mu$ M ITS-DNA 10  $\mu$ lを用意し、100℃、5 分間熱変性させる。
- (3) 変性DNAを氷上で急冷し、スポットの直前にITS-DNAに0.5倍量の20×SSCを加え希釈する。
- (4) メンブレンフィルターをろ紙の上に置き、ピペットの先を触れさせないように注意しながら、ITS-DNAを2  $\mu$ lスポットする。
- (5) メンブレンフィルターについた余分な水分をろ紙で吸い取った後、80℃、10 分乾燥させる。
- (6) ITS-DNAは紫外線照射によりメンブレンフィルターに固定する。

#### 【 0 0 3 4 】

メンブレンフィルターを用いたハイブリダイゼーションを行う場合において、ITS-DNAの標識は以下の条件下で行う。プローブの標識には、耐熱性アルカリホスファターゼ (AlkPhos Direct Labelling System System Amersham, Cat#RPN3680) を用いる。その他の標識を用いてもよい。

- (1) Cross-linker solution 10  $\mu$ lにキット付属の滅菌水 40  $\mu$ lを加えて希釈する。
- (2) 標識するITS-DNAを滅菌水で100 ng/ $\mu$ lとなるように希釈する。
- (3) 標識するITS-DNA 10  $\mu$ lをマイクロチューブに入れ、100℃、5 分間熱変性させる。
- (4) 変性ITS-DNAを氷上で急冷し、卓上遠心機で軽く遠心する。
- (5) (4)のITS-DNAに10  $\mu$ lのreaction bufferを添加する。反応は氷上で行い穏やかに混合する。
- (6) 2  $\mu$ lのlabelling reagentを添加する。反応は氷上で行い穏やかに混合する。
- (7) 希釈したCross-linker solutionを10  $\mu$ l加える。完全に混合した後卓上遠心機で軽く遠心する。
- (8) 37℃で30分間インキュベートする。

#### 【 0 0 3 5 】

メンブレンフィルターを用いたハイブリダイゼーションは、以下の条件下で行う。

- (1) ITS-DNAを固定したメンブレンフィルターを2×SSCで均一に湿らせる。メンブレンフィルターについた余分な水分をろ紙で吸い取る。
- (2) メンブレンフィルターを予めハイブリオープンで70℃に温めておいたハイブリダイゼーションバッファー (AlkPhos Direct Labelling System System Amersham, Cat#RPN3680に付属) に添加する。
- (3) マスキングのためにPCRプライマーまたはPCR産物に含まれるITSを除いたrDNA部分のPCR増幅物をハイブリダイゼーションバッファーに添加し70℃で30分、プレハイブリダイゼーションする。
- (4) プレハイブリダイゼーションで用いたバッファーに標識したITS-DNAを全て加える(このときにバッファーを少量とり、マイクロチューブ内で混ぜる)。
- (5) 70℃で2時間、インキュベートする(溶液が蒸発しないよう注意する)。
- (6) メンブレンフィルターを予め温めておいた1次洗浄バッファーに浸し50℃、10分間穏やかに振とうして洗浄する。2回繰り返す。
- (7) 新しい容器に250 mlの2次洗浄バッファーを入れ、メンブレンフィルターを浸し常温で5分間洗浄する。2回繰り返す。

#### 【0036】

メンブレンフィルターを用いたハイブリダイゼーションを行う場合において、シグナルの検出は以下の条件下で行う。検出は化学発光 (CDP Star, Amersham, Cat#RPN3682) で行う。

- (1) メンブレンフィルターから余分な2次洗浄バッファーを取り除き、サランラップにプロットされている面を上にして置く。
- (2) メンブレンフィルターにCDP-Star Detection reagentを800  $\mu$  l添加し、5分間放置する。
- (3) 余分なバッファーをろ紙で吸い取り、メンブレンフィルターを気泡がないようにサランラップでくるみ、プロット面が上になるようにフィルムカセットにセットする。暗室でフィルムを2時間、露光する。

#### 【0037】

本発明によるITS-DNA交雑形成は、メンブレンフィルターあるいはマイクロプレートを用いたDNAマクロアレイ法による純粋培養菌株の菌種レベルの同定に適

用できる以外に、多種の微生物が含まれるサンプルからの近縁種の検出を目的としたDNAマイクロアレイにも展開できる（図1C）。

#### 【0038】

中空系配列体DNAマイクロアレイを用いてハイブリダイゼーションを行う場合の例を、以下に示す。

#### 【0039】

DNAマイクロアレイへのITS-DNAの固定は、以下の条件下で行う。ITS-DNAの片鎖を中空系に固定し、ITS-DNAの濃度を3段階（例として、0.06、0.04、0.02  $\mu$ M）とし3点スポットする。スポットの固定には他の方法を用いてもよい。

#### 【0040】

DNAマイクロアレイを用いたハイブリダイゼーションを行う場合において、ITS-DNAの標識はPCR反応液中に蛍光色素Cy5を標識したPCRプライマー（ただし、DNAマイクロアレイに固定したITS-DNAの逆鎖とする）を加えることにより行う。他の標識法を用いてもよい。

#### 【0041】

DNAマイクロアレイを用いたハイブリダイゼーションは、以下の条件下で行う。

。

- (1) DNAマイクロアレイを滅菌水中で65℃、6時間浸漬させる。
- (2) ハイブリダイゼーション溶液 20×SSC 25  $\mu$ l、2% SDC 10  $\mu$ l、滅菌水15  $\mu$ lを作製し、37℃で保温する。
- (3) 標識した100 ng/ $\mu$ l ITS-DNA 50  $\mu$ lを94℃で2分間熱変性し、氷上で1分間急冷する。
- (4) DNAマイクロアレイをハイブリチャンバーにセットし調整した溶液100  $\mu$ lを入れ65℃、16時間ハイブリダイゼーションを行う。
- (5) 予め遠沈管に入れて50℃で保温しておいた0.05×SSC 10 ml中にDNAマイクロアレイを入れ50℃、40分間静置することで洗浄する。
- (6) 予め遠沈管に入れて50℃で保温しておいた新しい0.05×SSC 10 ml中にDNAマイクロアレイを入れ50℃、20分間静置することで洗浄する。
- (7) 4℃で5分間静置する。

**【0042】**

DNAマイクロアレイを用いたハイブリダイゼーションを行う場合、蛍光読み取り装置により検出を行う。

**【0043】**

ITS-DNA交雑形成を利用したDNAマイクロアレイ法およびDNAマイクロアレイ法は、純粋菌株の簡易・迅速同定その他、様々な環境中の微生物の菌種検出、同定に使うことができる。対象とする環境試料は水、土壌、大気、下水、廃水処理系などの他、食品、人・動物試料（糞便、唾液、その他）、臨床材料などが挙げられる。

**【0044】**

以下、実施例に基づいて、本発明をさらに詳述する。

**【0045】****【実施例】****（実施例1）**

光合成細菌であるRhodospirillum rubrum属の菌株を用いてメンブレンフィルターによるITS-DNA交雑形成試験およびゲノムDNA交雑形成試験を行い比較した。図2にITS-DNA交雑形成率とゲノムDNA交雑形成率との関係を示す。両者は $Y=X$ という1次関数の強い相関が示された。この結果はゲノムDNA交雑形成率の70%がITS-DNA交雑形成率の約70%に相当することを示している。

**【0046】****（実施例2）**

糞便試料からDNAを抽出し、抽出DNAから増幅・標識したITS-DNAを用いて基準株の腸内細菌のITS-DNAを固定したDNAマイクロアレイと交雑形成を行い、腸内細菌の種レベルでの検出を行った。図3に糞便試料ITS-DNAを用いたDNAマイクロアレイとの交雑形成で得られた腸内細菌の検出画像を示す。この結果は様々な試料中の微生物の菌種検出、同定にITS-DNAを用いたDNAマイクロアレイが有効であることを示している。

**【0047】****【発明の効果】**

請求項1記載の発明によれば、菌種または近縁種レベルでの識別が可能となる



という効果がある。また、ゲノムDNAと比較して、ITS-DNAはPCR等により遺伝子増幅可能であり、大量の培養を必要とせず、簡便・迅速な解析が可能になる点で有利である。また、高純度のITS-DNAを試験に用いることができるため、比較的高い再現性を持つ点で有利である。さらに、PCRにユニバーサルプライマーを用いることができるため、他の遺伝子を用いるよりもさらに簡便な解析ができる点でも有利である。

#### 【0048】

請求項2または3記載の発明によれば、菌種または近縁種レベルでの識別が可能となるという効果がある。

#### 【0049】

請求項4記載の発明によれば、菌種または近縁種レベルでの識別が可能となるという効果がある。また、多数の菌種を効率的に同定することが可能となるため、未知の環境試料中に含まれる菌種を検出・同定する場合に有利である。

#### 【0050】

請求項5記載の発明によれば、属レベルで特定菌種を固定化したマイクロアレイまたは既知の全菌種を固定化したマイクロアレイを用いることにより、菌種レベルでの識別が可能となるという効果がある。また、ゲノムDNAを用いた交雑形成法と比較して迅速・簡便である点で有利である。

#### 【0051】

請求項6記載の発明によれば、食材・食品・飲料由来の純粋菌株および食中毒菌由来のITS-DNAを固定化したマイクロアレイまたは既知の全菌株を固定化したマイクロアレイを用いることにより、近縁菌種レベルでの識別が可能となるという効果がある。また、同定結果からすぐに試料中に含まれる近縁菌株の性状を知ることができるから、特に有利である。

#### 【0052】

請求項7記載の発明によれば、臨床・腸内細菌を含む生体由来の純粋菌株を固定化したマイクロアレイまたは既知の全菌種を固定化したマイクロアレイを用いることにより、近縁菌種レベルでの識別が可能となるという効果がある。また、近年行われている群集解析法と比較しても、試料中に含まれる菌株を近縁種レベ

ルで検出でき、各菌株の相対比を見ることができる点で特に有利である。

【0053】

請求項8記載の発明によれば、特定な菌種を標的とするマイクロアレイまたは既知の全菌種を固定化したマイクロアレイを用いることにより、近縁菌種レベルでの識別が可能となるという効果がある。また、環境中の微生物検出においては、培養が困難な菌についても検出できる点で、さらに、多数の菌種を同時に効率よく同定できる点で有利である。

【0054】

【配列表】

Sequence Listing

<110> 平石 明 ; 株式会社エヌ・シー・アイ・エム・ビー・ジャパン

Hiraishi, Akira NCIMB Japan CO.,LTD

<120> 微生物の分子生物学的同定技術

<130> H15P1027

<160> 2

<210> 1

<211> 19

<212> RNA

<213> Escherichia coli

<400> 1

ggctggatca cctcctt

<210> 2

<211> 17

<212> RNA

<213> Escherichia coli

<400> 2

tgcccaaggc atccacc

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明による ITS-DNA 交雑形成技術の一例を示す概略図である。

【図 2】

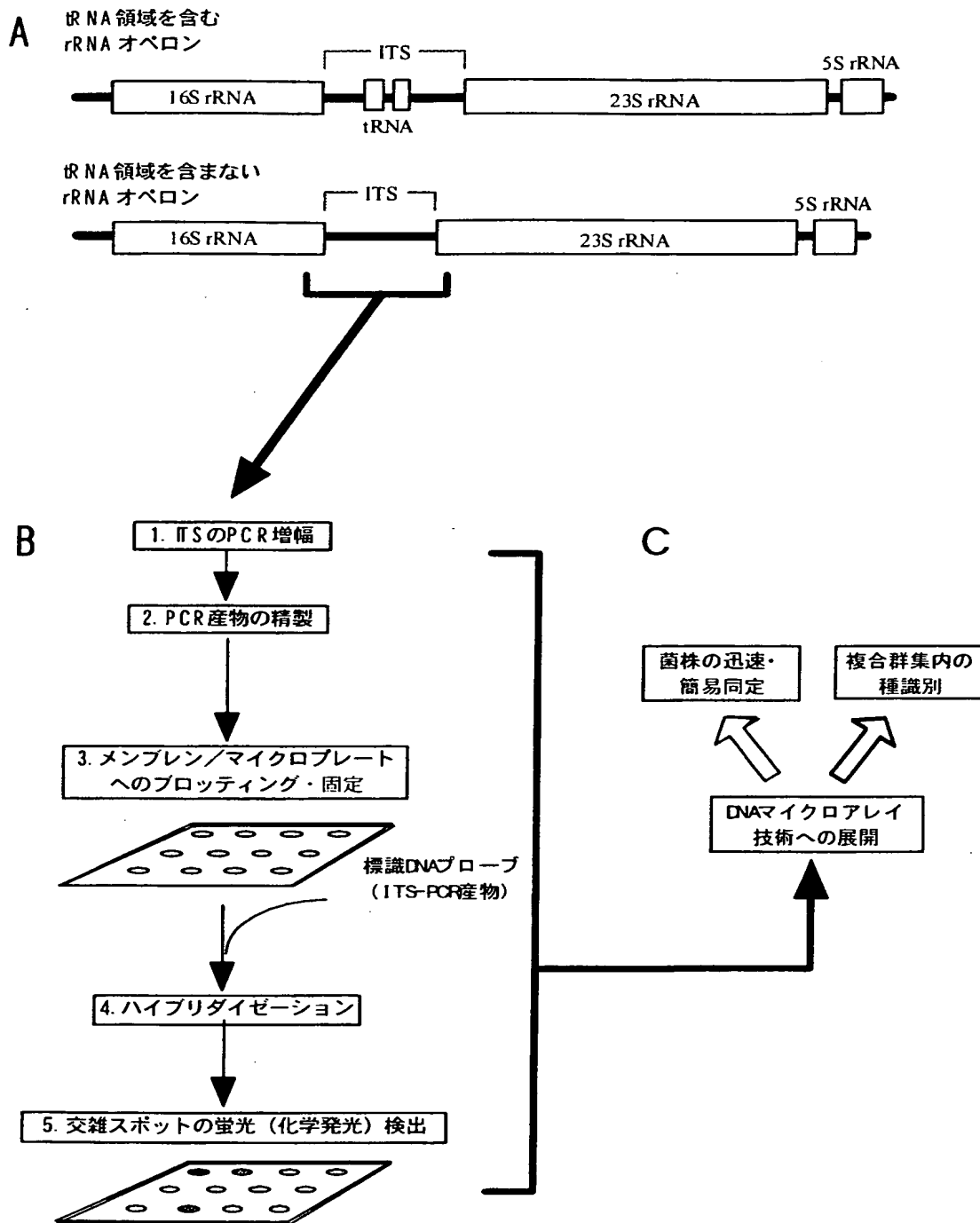
本発明による ITS-DNA 交雑形成率とゲノム DNA 交雑形成率との関係を示すグラフである。

【図 3】

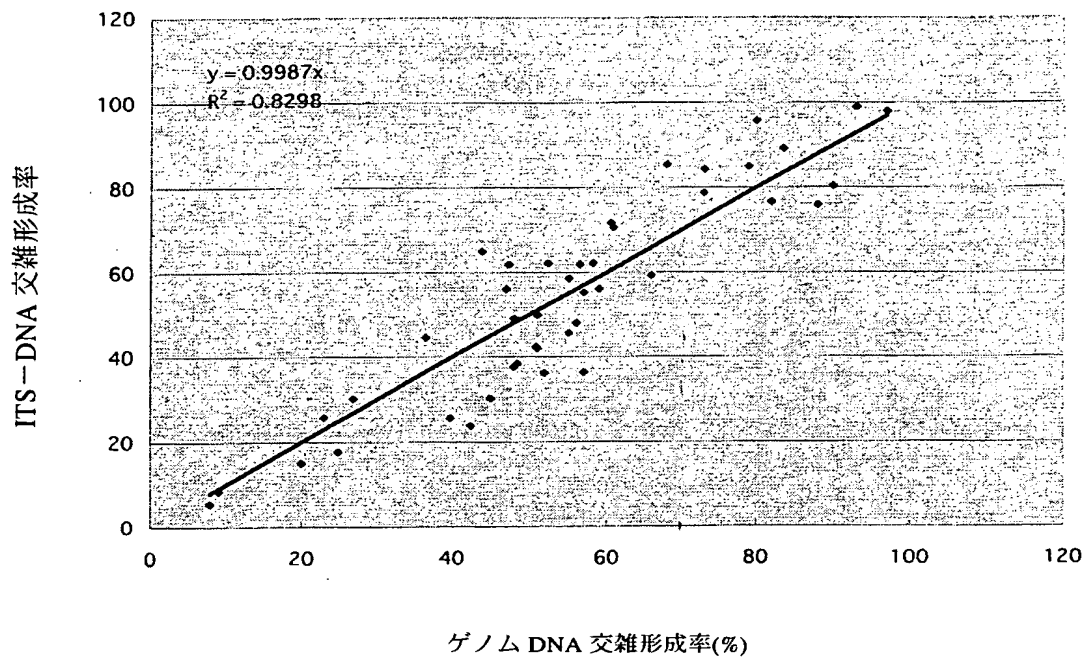
糞便試料 ITS-DNA を用いた DNA マイクロアレイとの交雑形成で得られた腸内細菌の検出画像を示す図である。

【書類名】 図面

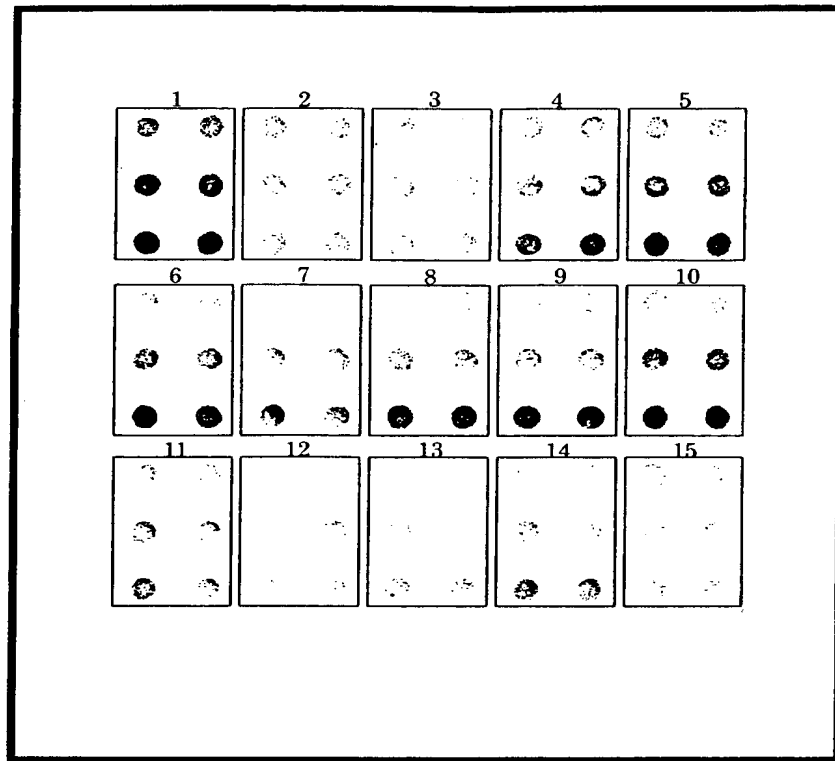
【図 1】



【図 2】



【図 3】



- |   |                                    |                                      |
|---|------------------------------------|--------------------------------------|
| 1 <i>Bifidobacterium adolescentis</i>       | 2 <i>Bifidobacterium angulatum</i> | 3 <i>Bifidobacterium angulatum</i>   |
| 4 <i>Bifidobacterium bifidum</i>            | 5 <i>Bifidobacterium breve</i>     | 6 <i>Bifidobacterium catenulatum</i> |
| 7 <i>Bifidobacterium gallicum</i>           | 8 <i>Bifidobacterium infantis</i>  | 9 <i>Bifidobacterium longum</i>      |
| 10 <i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> | 11 <i>Escherichia coli</i>         | 12 <i>Atopobium minutum</i>          |
| 13 <i>Lactobacillus brevis</i>              | 14 <i>Streptococcus bovis</i>      | 15 <i>Rhodopseudomonas palstris</i>  |
- スポット上の数字はサンプル番号を示す。濃度 3 段階で各 2 スポット

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

微生物を菌種レベルで迅速に識別・同定する技術を開発する。また、その技術により環境微生物の検出・同定を試みる。

【解決手段】

ITS-DNAの交雑形成技術を用いることにより、微生物を菌種レベルで迅速に識別・同定する。また、その原理をDNAマイクロアレイに応用することにより、環境微生物の検出・同定を行う。ITS-DNAの交雑形成を用いることにより、また、ITS-DNAの交雑形成技術をDNAマイクロアレイに応用することにより、菌種または近縁種レベルでの識別が可能となる。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 3 - 1 6 8 9 4 1
受付番号	5 0 3 0 0 9 9 1 6 1 0
書類名	特許願
担当官	神田 美恵 7 3 9 7
作成日	平成 1 5 年 7 月 2 9 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】 平成 15 年 6 月 13 日



特願 2 0 0 3 - 1 6 8 9 4 1

出 願 人 履 歷 情 報

識別番号

[ 5 0 1 4 6 6 3 0 7 ]

1. 変更年月日

2 0 0 1 年 1 2 月 3 日

[変更理由]

新規登録

住 所

愛知県豊橋市北山町字東浦 2 - 1 合同宿舍 5 - 3 0 2

氏 名

平石 明

特願 2 0 0 3 - 1 6 8 9 4 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 3 9 8 0 0 4 1 6 1 ]

1. 変更年月日            2 0 0 3 年    6 月 1 1 日  
    [変更理由]            住所変更  
        住    所            静岡県静岡市清水七ツ新屋 5 4 9 番の 1  
        氏    名            株式会社エヌ・シー・アイ・エム・ビー・ジャパン
  
2. 変更年月日            2 0 0 3 年    8 月    1 日  
    [変更理由]            住所変更  
        住    所            静岡県静岡市清水船越南町 7 6 8 番地の 2 7  
        氏    名            株式会社エヌ・シー・アイ・エム・ビー・ジャパン